

UNTERSUCHUNGEN ZUR NATUR DES SERUMINSULINS

ELMAR SIESS

1966

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL

Untersuchungen zur Natur des Seruminsulins

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

ELMAR SIESS

aus

Vilshofen

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. O. Wieland
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan:	Prof. Dr. M. Kiese
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.1966

Teil I

Eine vereinfachte Fettgewebsmethode
zur Insulinbestimmung im Serum



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547415_0057

Summary. Perfusion of isolated rat liver for periods up to six hours resulted in the steady release of a substance — of hepatic origin — which stimulates the oxidation of glucose-1- ^{14}C to $^{14}\text{CO}_2$ by rat epididymal adipose tissue. The activity of the substance, therefore, resembles that of insulin ("hepatic ILA"); however, the activity is not suppressed by the addition of anti-insulin antibodies obtained in guinea pigs. This hepatic ILA is released whether or not pancreatic insulin is added to the circulating medium and thus does not represent a metabolite of added pancreatic insulin. It has properties similar to those of "non-suppressible" ILA of human serum. The rate of production of hepatic ILA in the perfused rat liver is sufficient to warrant consideration of its contributing to a major extent to the maintenance of serum levels of "non-suppressible" ILA, particularly in pancreatectomized animals. Also described in this paper is an activation of the biologic activity of crystalline insulin as a result of heating in bicarbonate buffer (Table 1) and it is suggested on the basis of ultracentrifugation studies that this might be the result of "disaggregation" of insulin into smaller units.

Résumé. Au cours de perfusions de foie isolé de rat, les auteurs décrivent, pendant des périodes allant jusqu'à six heures, la formation d'une substance hépatogène capable de stimuler l'oxydation de glucose-1- ^{14}C en $^{14}\text{CO}_2$ par la graisse épидидymaire de rat. Cette substance a donc une activité de type insulinique («ILA hépatique»), mais cette activité n'est pas supprimée par l'adjonction d'anticorps anti-insuline obtenus chez le cobaye. La formation de cette ILA hépatique ne nécessite pas la présence

1959 berichtete LEONARDS über das Vorkommen zweier Substanzen im Blutserum mit insulinartiger Wirkung auf die in vitro $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus 1- ^{14}C markierter Glukose durch das epididymale Fettgewebe der Ratte³⁰. Nach diesen Befunden war nur ein kleiner Teil der Gesamtinsulinaktivität (ILA) des Serums mit Insulinantikörpern (IAK) hemmbar. Spätere Untersucher sprachen von einem „freien“⁴, „hemmbaren“¹⁷, „typical“^{43, 44}, „circulating“⁴⁵ bzw. von dem „gebundenen“, „nichthemmbaren“, „atypischen“ oder „pancreatic“ Insulin, um das Pankreasinsulin, dessen Primärstruktur für viele Tierarten aufgeklärt wurde^{38, 3, 25, 56, 22}, von dem noch weitgehend unbekannten Stoff mit insulinähnlicher Wirkung (ILA) zu unterscheiden. Ganztierversuche mit dem Ziel, die Quelle der nichthemmbaren ILA aufzufinden, führten SAMAN et al. zu der Ansicht, daß die Hundeleber in der Lage sei, „typical“ ILA in die atypische Form überzuführen⁴³. BÜRG et al. versuchten daraufhin nach Angebot von hemmbarem Ratteninsulin an die isolierte

d'insuline pancréatique exogène dans le milieu de perfusion et n'est donc pas l'insuline pancréatique exogène modifiée. Son activité ressemble à celle de l'«ILA non supprimable» du sérum humain. La production de cette substance par le foie perfusé est suffisamment active pour qu'il soit possible d'admettre qu'elle contribue peut-être à la formation de l'activité insulinique nonsupprimable du sérum et donc à sa persistance après pancréatectomie. Le rapport fait également état (Tableau 2) d'une activation thermique de l'effet biologique de solution d'insuline dans un tampon bicarbonate.

Zusammenfassung. Die isolierte Rattenleber gibt bei Durchströmung bis zu 6 Stunden eine Substanz an das Medium ab („hepatische ILA“), die wie Insulin die Glukose-1- ^{14}C -Oxydation durch das Rattennebenhodentfettgewebe stimuliert, jedoch durch Insulinantikörper aus Meerschweinchenserum nicht unterdrückbar ist. Die hepatische ILA ist nicht an die Zufuhr von Pankreasinsulin gebunden, stellt also kein Umwandlungsprodukt von freiem Insulin dar. Sie ähnelt in ihren Eigenschaften der nichthemmbaren Serum-ILA des Menschen. Entsprechend der Bildungsrate hepatischer ILA im Perfusionsversuch könnte die Leber quantitativ einen maßgeblichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der nichthemmbaren Serum-ILA liefern. Im Zuge der vorliegenden Untersuchungen wurde außerdem beobachtet, daß die biologische Aktivität von Rinder-Kristallinsulin durch kurzes Erwärmen im Bicarbonatpuffer zunimmt (Tabelle 1). Der Effekt beruht möglicherweise auf einer thermischen Dissoziation des Insulins in Untereinheiten.

Rattenleber den direkten Nachweis der Umwandlung in nichthemmbare ILA zu führen, was jedoch — selbst unter Anwendung von Insulinmengen bis zu $10^4 \mu\text{E/ml}$ Perfusat nicht gelang⁵. Nach eigenen Untersuchungen, über die im folgenden berichtet wird, scheint dagegen der Leber eine quantitativ beachtliche Rolle bei der Bildung einer nicht durch IAK hemmbaren ILA („hepatische“ ILA) zuzukommen. Über einige dieser Ergebnisse ist von E. SIESS schon kurz an anderer Stelle berichtet worden⁴⁷.

Methodik

Antikörpererzeugung: Die Methode der AK-Erzeugung beim Meerschweinchen nach MOLONEY et al.³⁷ durch Injektion eines gleichteiligen Gemisches aus FREUNDS Adjuvans¹⁵ und Rinderkristallinsulin in 0,004 N HCl in 14-tägigen Abständen wurde abgeändert, um die auch von anderer Seite⁵⁵ beobachteten, an der Injektionsstelle auftretenden Geschwürsbildungen

zu vermeiden. Dies gelang bei Anwendung eines Antigengemisches aus 2 Teilen Insulinlösung* (2 mg/ml) in 0,004 N HCl, 1 Teil Tween 80 und 1 Teil Paraffinöl, das unter die Nacken- oder die Rückenhaut injiziert wurde. 1 ml dieser Mischung wurde pro Tier in 14-tägigen Abständen verabreicht. In ihrer Wirksamkeit standen die auf diese Weise erzeugten AK den mit FREUNDS Adjuvans erhaltenen nicht nach.

Gewinnung der Antisera: Die Blutentnahme erfolgte am 10. Tag nach der letzten Injektion (nach 6- bis 7maliger Immunisierung) durch Herzpunktion in Äthernarkose. Das Blut wurde 1 bis 2 Std bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C stehen gelassen und am nächsten Tag zentrifugiert. Die meisten Seren waren leicht hämolytisch. Sie wurden auf 50 ml-Portionen verteilt und in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt.

Antikörperanreicherung: Zur AK-Isolierung trennten wir zunächst nach HOŘEŠÍ et al.²⁴ — modifiziert nach LI et al.³¹ — die Gammaglobuline durch Rivanolfällung ab: Zu 25 ml Serum (pH 8,5) ließen wir unter Kühlung im Eisbad in 10 min 88 ml 0,4%ige wässrige Rivanollösung (pH 8,5) unter mechanischem Rühren zutropfen. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wurden pro 15 ml Überstand 2 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Nach Einstellen des pH auf 5,5 mit 2 N H₂SO₄ wurde die klare Lösung zur Abtrennung des Rivanols über eine Amberlite IRC — 50 Säule (innerer Durchmesser 4 cm, Höhe des Austauscherharzes 2,5 cm) geschickt, die mit 0,2 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,5 — enthaltend 0,5 M Ammoniumsulfat — vorgewaschen war. Die AK-haltigen Eluate wurden 8 bis 10 Std gegen dest. Wasser bei 4°C dialysiert und dann gefriergetrocknet. Die Lyophilisate lösten wir in 0,005 M K₂HPO₄ und dialysierten nochmals bis zur Einstellung konstanter Leitfähigkeit und H⁺-Konzentration gegen die gleiche Phosphatlösung.

Zur weiteren Reinigung wurde die Proteinlösung, die im wesentlichen nur noch γ -Globulin enthielt, auf eine DEAE-Cellulosesäule (innerer Durchmesser 2 cm, Höhe des Austauschermaterials 35 cm) aufgetragen und mit steigenden Phosphatkonzentrationen beginnend von 0,005 M K₂HPO₄ bis 0,12 M KH₂PO₄ und fallendem pH-Gradienten nach SOBER et al.⁵² in der Modifikation von FAHEY et al.¹⁴ eluiert. Nach diesem Vorgehen fand sich die AK-Aktivität auf die Fraktionen 9 bis 16 (je 5,5 ml) verteilt. Sie wurden vereinigt und bei 4°C aufbewahrt. Hierbei blieb die Aktivität mindestens 3 Wochen unverändert. Dagegen trat durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen rascher Wirksamkeitsverlust ein.

Bei einer Ausbeute von 50–80% stieg nach dem beschriebenen Anreicherungsverfahren die spez. AK-Aktivität um das 20- bis 30-fache gegenüber Nativserum an. Die Vorreinigung mit Rivanol scheint wesentlich zu sein, da andere Autoren durch direkte säulenchroma-

tographische Auftrennung des Antiserums nur 10-fache Anreicherung erzielen⁶⁰. In der Ultrazentrifuge sedimentierte unsere Fraktion als symmetrischer Gipfel mit einer Sedimentationskonstante von 6,58 Svedberg-E.*

Titerbestimmung: Die Bestimmung des AK-Titers führten wir im biologischen Test mit dem Nebenhodentfettgewebe der Ratte durch. Die von uns vereinfachte Methode der Gewebeinkubation und der Messung des aus 1-¹⁴C markierter Glukose entwickelten markierten CO₂ wird an anderer Stelle ausführlich beschrieben⁴⁸.

Zur Bestimmung der AK-Aktivität wurden jeweils 0,2 ml Insulinlösung mit einem Gehalt von 4000 μ E Rinderinsulin mit 0,2 ml AK-Lösung gemischt, 90 min bei 37°C inkubiert und von der Mischung 0,05 ml in den Fettgewebstest eingesetzt. Zur Standardisierung des Titers wurde diejenige AK-Verdünnung gewählt, die Halbhemmung einer Eichdosis von 500 μ E Insulin pro Ansatz bewirkte. Um diese AK-Konzentration zu ermitteln, mußten für jede Titerbestimmung mindestens vier verschiedene Verdünnungen getestet werden. Aus der hierbei erhaltenen Hemmungskurve wurde der Titer interpoliert. Da zwischen AK-Verdünnung und der nach der Vierpunkt-Eichkurve noch vorliegenden Insulinaktivität eine nichtlineare Beziehung gefunden wurde⁴⁶, muß man sich zur Titerbestimmung in einem Bereich bewegen, der nicht zu weit von der Halbhemmungskonzentration abweicht.

Bestimmung der hemmbaren- und nichthemmbaren ILA im Perfusionsmedium: Die der Mischkammer entnommenen Perfusatsproben (8 ml) wurden bis zur Beendigung der Durchströmung bei 4°C stehen gelassen, sodann gemeinsam bei Zimmertemperatur 5 min zentrifugiert und die Überstände über Nacht bei 4°C gegen phosphatfreie Krebs-Bicarbonat-Ringerlösung (KBR,²⁷) dialysiert. Im Test wurden zu je 1 ml Dialysat 0,1 ml gereinigter AK-Lösung (entsprechend ca. 100 μ g Protein) oder anstatt dessen 0,1 ml KBR gegeben. Nach 90 min Inkubation der Ansätze bei 37°C wurden aliquote Mengen von je 0,4 ml für die ILA-Bestimmung eingesetzt.

Leberperfusion: Die Durchströmung der isolierten Rattenleber erfolgte im rezirkulierenden System nach MILLER et al.³⁵ und nach BRAUER et al.². Die Einzelheiten der Methode und die Zusammensetzung des Perfusionsmediums nach⁴⁵ sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben³⁴. Als Spendertiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 200–250 g (Lieferant: W. Gassner, München-Ottobrunn), die mit einer Standard-Diät (Altromin R, Fa. Lage/Lippe) und Wasser ad libitum gefüttert wurden.

Um die Anoxiephase zu verkürzen, wurde die Präparation der Leber folgendermaßen abgeändert: Vor Kanülierung der Pfortader wurde eine feste Ligatur an der

* Für die Überlassung von Rinder-Kristallinsulin danken wir Herrn Prof. H. MASKE, Farbwerke Hoechst A.G., Frankfurt-Hoechst.

* Für die Ultrazentrifugen-Untersuchungen sind wir Fräulein I. HÖFER, Spinco-Abt. der Fa. Beckman Instr., München, zu großem Dank verpflichtet.

Stelle der Vereinigung der Mesenterialvenen gelegt. Der Faden, mit dem die Pfortader im lebernahen Bereich unterlegt war, wurde unter leichtem Zug gehalten, so daß für den Augenblick des Einführens der Kanüle Blutleere im Operationsgebiet der V. portae herrschte. Dies erleichterte den Vorgang wesentlich. An die liegende Pfortaderkanüle wurde unmittelbar eine Infusion von oxygeniertem Blutgemisch (ohne Antibioticumzusatz) in situ angeschlossen, wodurch die Anoxiephase auf 30–60 sec abgekürzt wurde. Nach der Kanülierung der V. cava sup. in üblicher Weise wurde der Oberkörper der Ratte oberhalb des Zwerchfells abgetrennt, so daß die Durchströmungsflüssigkeit ungehindert durch die nun freiliegende Kanüle der oberen Hohlvene abfließen konnte. Zuletzt wurde die Leber herauspräpariert und an die Perfusionsapparatur angeschlossen, was eine nochmalige kurze Anoxieperiode von maximal 5 sec verursachte. Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde die Perfusion zur Einstellung konstanter Bedingungen 30–45 min laufen gelassen.

Da damit zu rechnen war, daß Zink, welches nach MASKE^{32, 33} zusammen mit Insulin das Pankreas verläßt, möglicherweise in den weiteren Stoffwechsel des Insulins eingeschaltet ist, stellten wir in Nachahmung der physiologischen Verhältnisse durch Zugabe von 0,5 ml ZnSO_4 -Lösung das Perfusionsmedium auf einen Zinkspiegel von $1 \mu\text{g}$ pro ml ein^{13a}. 10–15 min später erfolgte die erste Blutentnahme, im folgenden als Nullabnahme bezeichnet. Weitere Proben wurden jeweils in einer Menge von 8 ml nach 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 und 360 min abgenommen. In den Durchströmungsversuchen mit Insulin wurden in der Regel 20 mE Rinderkristallinsulin (Farbwerke Hoechst) in die Mischkammer gegeben und sofort anschließend mit einer automatischen Infusionsspritze 18 mE pro Std laufend bis zum Beginn der fünften Std zugeführt.

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt das Ergebnis eines Versuches, in dem die Leber mit Zusatz von Insulin durchströmt wurde. Die Gesamtinsulinaktivität sowie die durch AK nicht-hemmbar ILA des Perfusates — ausgedrückt in Nettoimpulsen $^{14}\text{CO}_2$ — sind in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer aufgetragen. Zur Berechnung der Netto- $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion wurde die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung des Fettgewebes in reiner Pufferlösung von der Gesamtzahl der gemessenen Impulse in Abzug gebracht.

Bei großem AK-Überschuß beobachteten wir regelmäßig weniger Impulse, als der Gewebeeigenproduktion entsprach. Dieses Verhalten dürfte auf die Neutralisation endogenen, am Fettgewebe haftenden Insulins zurückzuführen sein. Dies ließ sich durch Untersuchungen der Insulinbindung am Fettgewebe erhärten: Inkubiert man Fettgewebe bei 25°C in 0,5 ml KBR mit 1000 μE Kristallinsulin verschieden lange Zeiten und testet anschließend in einem insulinfreien KBR-Medium, so findet man das Maximum der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung (und damit der Insulinfixierung) nach etwa 10 min Inkubation. Um die Festigkeit der Gewebefixierung zu prüfen, wurden etwa 20 mg schwere Fettgewebstückchen wie beschrieben 20 min inkubiert und sodann durch leichtes Hin- und Herschwenken in insulinfreiem Medium gewaschen. Nach 20 min Waschkdauer verliert das Fettgewebe durch Fortsetzung der Wäsche nur mehr sehr wenig an Aktivität. In den Waschflüssigkeiten stiegen die Impulse korrespondierend an. Die Erscheinung der Insulinbindung am Fettgewebe, jedoch un-

ter Einsatz 500mal höherer Insulinkonzentrationen, wurde schon von HAUGAARD et al. beobachtet²³.

Aus Abb. 1 geht hervor, daß die nichthemmbare ILA im Durchströmungsmedium kontinuierlich über



Abb. 1. Verhalten der Gesamt-ILA und der nichthemmbaren ILA im Verlauf einer Leberperfusion. Die ILA-Aktivitäten sind in $^{14}\text{CO}_2$ -Nettoimpulsen pro min — bezogen auf Fettgeweboberfläche⁴⁸ — angegeben. Zum Zeitpunkt 0 wurden 20 mE krist. Rinderinsulin als Stoß und anschließend 18 mE/Std als Dauerinfusion über 5 Std. zugegeben. Vol. 150 ml.

● — Gesamt-ILA ○ — nichthemmbare ILA

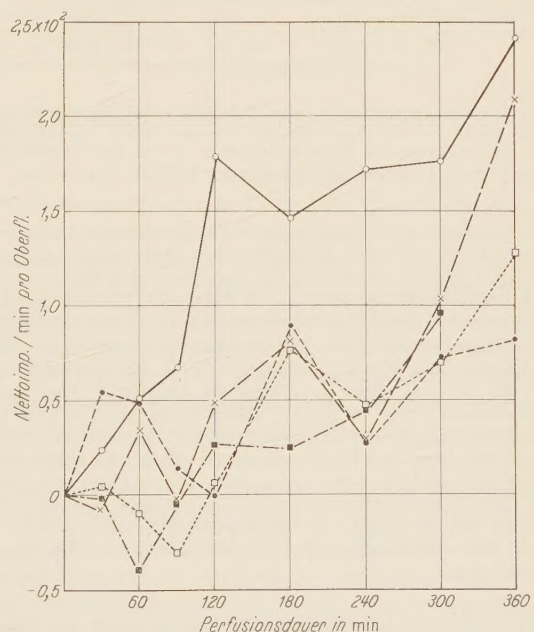


Abb. 2. Bildung nichthemmbarer ILA durch die isolierte Rattenleber. Aktivitätsangabe wie in Abb. 1. Gegenüberstellung der Experimente mit und ohne Insulinzusatz zum Medium

○ — mit Insulinzusatz, Dosierung vgl. Abb. 1
 ● — — — — — ohne Insulinzusatz, Dosierung vgl. Abb. 1
 × — — — — — mit Insulinzusatz, ohne Insulinzusatz
 □ — — — — — ohne Insulinzusatz, ohne Insulinzusatz

die gesamte Versuchsdauer von 6 Std ansteigt. Daß es sich hierbei nicht um eine Umwandlung des zugesetzten Insulins in eine nichthemmbare Form handelt, ergab sich in Experimenten, in denen die Leber mit insulinfreiem Medium perfundiert wurde. In Abb. 2 erkennt man, daß es auch in Abwesenheit von Insulin zu einer ähnlichen Bildung nichthemmbarer ILA kommt, wie in den Vergleichsversuchen mit Insulin.

Um Aufschluß über die Menge der gebildeten hepatischen ILA zu erhalten, wurde in vier weiteren Experimenten die Gesamtzahl der nach fünfständiger Perfusion vorliegenden μE bestimmt. Es fanden sich in einem Fall 100 (nach 3 Std 77), in den anderen Fällen 60,45 und 55 μE nichthemmbarer ILA pro ml. Dies entspricht einer mittleren Kapazität der Rattenleber zur Bildung von 1300 $\mu\text{E}/\text{Std}$.

Wie zu erwarten, tritt bei „Leerperfusion“, d. h. im analogen System ohne Leber, keine nichthemmbare ILA auf (Abb. 3).

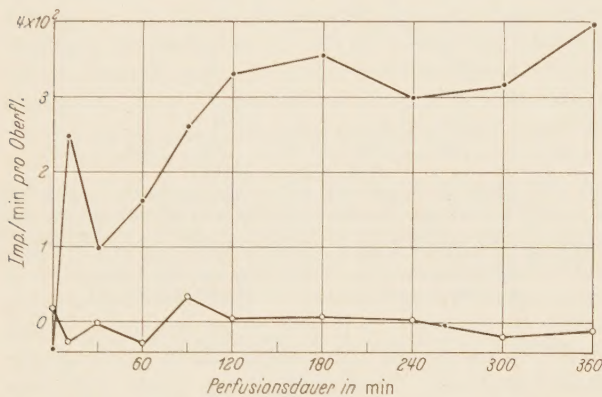


Abb. 3. Kontrollperfusion ohne Leber. Insulinaktivität des zirkulierenden Mediums mit (○—○) und ohne (●—●) Zusatz von Insulinantikörper. Zum Zeitpunkt 0 einmalige Zugabe von 40 mE Rinderinsulin. Durchströmungsvolumen 150 ml

Bei diesem Versuch ergab sich als bemerkenswerter Nebeneffekt, daß die Aktivität des zugesetzten Insulins im Laufe der Durchströmung anstieg, obwohl nur eine einmalige anfängliche Zugabe erfolgt war. Dies steht möglicherweise mit folgender Beobachtung im Zusammenhang, wonach Insulin durch Erwärmen aktiviert wird. So führt z. B. 10 min Inkubation des verwendeten Rinderinsulins in KBR bei 50°C zu einer 8–10fachen Aktivitätssteigerung. Diese Versuche sind in Tab. 1 zusammengestellt. Aus Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge* ergaben sich Hinweise dafür, daß die Erwärmung zu einer Disaggregation des Insulins in kleinere, biologisch aktive Untereinheiten führt. Der Aktivitätssteigerung des zugesetzten Insulins während der 7-stündigen Blindperfusion bei 37°C (vgl. Abb. 3) könnte eine ähnliche thermische Beeinflussung zugrunde liegen.

Zur näheren Charakterisierung des von der Leber gebildeten Faktors wurden einige seiner Eigenschaften im Vergleich zu Kristallinsulin und zu nichthemmbarer menschlicher Serum-ILA untersucht. Wie Tab. 2

Tabelle 1. Thermische Aktivierung von Rinder-Kristallinsulin. Insulinlösungen von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KBR wurden 10 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und anschließend mit der Fettgewebemethode getestet. Vor dem Test wurde zur Korrektur der pH-Verschiebung 2,5 min mit Carbogen begast

Versuch	10 min inkubiert bei °C	Insulin-aktivität	erwärmt nicht erwärmt
1	70		3,5
2	70		4,0
3	70		3,5
4	50		9,6
5	50		7,9

Tabelle 2. Eigenschaften der nichthemmbaren ILA der Rattenleber im Vergleich zu Kristallinsulin und zu nichthemmbarer Serum-ILA. Lit. vgl. (41,21)

	Kristallinsulin	Serum-ILA	hepatische ILA
Hemmbar durch Insulin-Antikörper	+	+	—
Inaktivierbar durch Cystein	+	—	—
Inaktivierbar durch Wärme (50°C, 10 min)	—	+	++
Dialysierbar	—	—	—
Extrahierbar mit HCl-Alkohol	+	+	+

zeigt, weist unsere Substanz Ähnlichkeiten mit der nichthemmbaren Serum-ILA auf, deren von FROESCH et al. beschriebene Merkmale^{16,17} wir bestätigt fanden. Bei Wärmebehandlung erwies sich die hepatische ILA allerdings als beträchtlich labiler. Bei Extraktion mit HCl-Äthanol betrug die Ausbeute etwa 50%.

Diskussion

Nach den vorliegenden Untersuchungen könnte der Leber eine maßgebliche Rolle als Produktionsstätte nichthemmbarer Serum-ILA zukommen. Nach BÜRGI et al. beträgt der Serumspiegel der Ratte an nichthemmbarer ILA 110 $\mu\text{E}/\text{ml}$ ⁵. Bei einer angenommenen Blutmenge der Ratte von 15 ml wäre die Leber bei der von uns gemessenen Kapazität von 1300 $\mu\text{E}/\text{Std}$ in der Lage, den gesamten Bestand an nichthemmbarer Serum-ILA in 1–2 Stunden aufzubauen. Hierbei muß allerdings die Frage der Abbaugeschwindigkeit der hepatischen ILA noch offen gelassen werden.

Was den Entstehungsmechanismus der hepatischen ILA betrifft, so ergeben sich aus unseren Versuchen keine Anhaltspunkte für eine Umwandlung freien, mit AK hemmbaren Insulins in eine nichthemmbare Form, wie dies von SAMAAAN et. al. vermutet wird⁴³. Vielmehr ist die ILA-Produktion der isolierten Leber nicht an die Zufuhr von Pankreasinsulin gebunden, sondern stellt eine eigenständige Leistung der Leber dar. BÜRGI et al., die die Frage der Insulinumwandlung durch die Rattenleber ebenfalls in Perfusionsversuchen prüften, konnten nach Zufuhr von Ratteninsulin keine Bildung nichthemmbarer ILA beobachten⁵. Versuche ohne Insulinzusatz wurden von den genannten Autoren nicht durchgeführt. Für die Diskrepanz zwischen ih-

* vgl. Fußnote S. 22.

ren und unseren Ergebnissen, könnten verschiedene methodische Unterschiede verantwortlich sein. Dies gilt vor allem für die Empfindlichkeit der Insulinbestimmungsmethode, deren untere Grenze von der Schweizer Gruppe bei 50 $\mu\text{E}/\text{ml}$ gezogen wird, während wir Mengen bis herab zu 20 $\mu\text{E}/\text{ml}$ erfaßten. Nach unseren Versuchen betrug die Bildung an hepatischer ILA in 5 Std im Mittel 65 $\mu\text{E}/\text{ml}$ Perfusat. Geht man hiervon aus, so wäre es verständlich, daß sich den Schweizer Autoren, die zudem mit einem größeren Perfusionsvolumen (200 ml) arbeiteten, die nichthemmbare ILA dem Nachweis entzog. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß wir dem Perfusionsmedium Zink in physiologischen Konzentrationen zusetzten. Inwieweit Zinkionen tatsächlich einen essentiellen Faktor für die Bildung hepatischer ILA darstellen,

und der Achromobacter-Gruppe gefunden*. Wie Kontrollversuche ohne Fettgewebe ergaben, entfallen jedoch auf diese Bakterienverunreinigung maximal 3% der Gesamtpulse, so daß auf eine Korrektur verzichtet werden konnte. Auch das infolge Hämolyse zunehmend auftretende Hämoglobin konnte als Störquelle der Insulinbestimmung ausgeschlossen werden⁴⁶.

Bei Leberperfusionen mit Rattenblut fanden COHEN und GORDON eine durchschnittliche Plasma-proteinzunahme von 160 mg in 5 Std⁷. Davon waren etwa 50 mg immunologisch nachweisbares, lebereigenes Protein²⁰, während von den restlichen 110 mg rund die Hälfte auf neusynthetisiertes Albumin entfällt¹⁹. Da Albumin die Glukoseoxydation des Fettgewebes nicht stimuliert^{1, 26, 46}, wird man die von uns beobachtete hepatische ILA in dem während der Durchströmung

Tabelle 3. Stoffe mit stimulierender Wirkung auf die D-Glukose-1-¹⁴C-Oxydation des Fettgewebes. Literaturangaben in Molaritäten wurden in μg umgerechnet

Substanz	physiol. Blut- spiegel pro ml	Lit.	in vitro wirk- same Menge pro ml	Lit.	Schwellendosis in vitro physiol. Plasmaspiegel
ACTH	$5 \times 10^{-3} \mu\text{g}$	(10)	$10^2 \mu\text{g}$	(28)	2×10^4
Adrenalin	$10^{-7} \mu\text{g}$	(13)	$2 \times 10^{-1} \mu\text{g}$	(6)	2×10^6
Noradrenalin	$10^{-6} \mu\text{g}$	(13)	$2 \times 10^{-1} \mu\text{g}$	(6)	2×10^5
Glucagon (reduziert)	$3 \times 10^{-1} \mu\text{g}$	(54)	$4 \times 10^{-1} \mu\text{g}$	(59)	1,3
Insulin	279 μE	(46)	20 μE	(46)	7×10^{-2}
ILA nichthem- bar, hepatisch	186 μE	(diese Arbeit)	20 μE	(diese Arbeit)	$1,1 \times 10^{-1}$
Nicotinsäure	4–8 μg	(9)	123 μg	(29)	20
Oxytocin	0–80 μE	(12)	$10^3 \mu\text{E}$	(36)	25
Prolactin	4 μg	(50)	$10^3 \mu\text{g}$	(58)	250
STH	0,2–0,5 μg	(11)	$10^3 \mu\text{g}$	(57)	$2,5 \times 10^3$
Vasopressin	37 μE	(12)	$6 \times 10^6 \mu\text{E}$	(39)	$1,6 \times 10^4$

bedarf allerdings noch systematischer Untersuchungen. Schließlich könnte es eine Rolle spielen, daß wir zur Entfernung eventueller Hemmstoffe des Insulintestes, wie z.B. Glukosamin⁴⁹, die Perfusatproben routinemäßig dialysierten.

Was die Natur der hepatischen ILA betrifft, so können die bisher bekannten Stoffe mit steigernder Wirkung auf die Oxydation des ersten C-Atoms der Glukose weitgehend ausgeschlossen werden. Die in Frage kommenden Substanzen sind in Tab. 3 zusammengestellt. Aus dem Verhältnis der in vitro wirksamen Mengen zu den physiologisch auftretenden Blutkonzentrationen in der letzten Spalte sieht man, daß nur im Falle des Insulins die physiologischen Konzentrationen über den im Test zu erfassenden Mindestmengen liegen. Soweit es sich um niedermolekulare Verbindungen handelt, ist ohnedies durch die vorausgehende Dialyse mit ihrer Eliminierung zu rechnen.

Da im Laufe der vielstündigen Perfusionen trotz Antibioticumzusatz mit dem Aufkommen von Bakterien zu rechnen war, die den Test durch 1-¹⁴C Oxydation der Glukose verfälschen konnten, wurden Proben der Durchströmungsflüssigkeit bakteriologisch untersucht und dabei Keime der Alkaligenes-Gruppe

außer Albumin neugebildeten Proteinanteil suchen dürfen.

LEONARDS³⁰, GOLDBERG und EGDAHL¹⁸ und STEINKE et al.⁵³ wiesen noch am 7. und 8. Tag im Plasma pankreatektomierter Tiere mit dem Fettgewebstest eine insulinartig wirkende Substanz nach, die sich nicht mit IAK hemmen ließ. SAMAAAN et al. halten es für möglich, daß diese nach Pankreasexstirpation noch nachweisbare ILA durch Umwandlung von hemmbarem Insulin aus eventuell im Darm befindlichen Inselzellen durch die Leber entsteht⁴⁴. Dies erscheint schon aus quantitativen Überlegungen heraus wenig wahrscheinlich. Geht man davon aus, daß die nichthemmbare Serum-ILA beim pankreaslosen Tier um 50% absinkt⁵³, so müßte die Insulinproduktion des Darmes etwa der des Pankreas entsprechen. Wir möchten auf Grund unserer Untersuchungen eher annehmen, daß die nach Pankreatektomie persistierende, nichthemmbare Serum-ILA hepatischen Ursprungs und möglicherweise mit der hier beschriebenen hepatischen, nichthemm-

* Herrn Prof. Dr. G. LINZENMEIER, Institut für Hygiene und Med. Mikrobiologie der Universität München, sind wir für die Durchführung dieser Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet.

baren ILA identisch ist. In diesem Sinne wäre es auch zu verstehen, daß als Folge von Leberschädigungen, sei es durch Anoxie im Anschluß an Ligierung der A. hepatica⁴¹, sei es durch Vergiftung mit Alloxan^{8,40} oder auch bei Leberkrankheiten⁴² der Serumspiegel an nichthemmbarer ILA regelmäßig absinkt.

Für großzügige Unterstützung der vorliegenden Arbeiten danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, dem bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus und der Eli Lilly Company, Indianapolis, USA.

Literatur. BEIGELMAN, P.M. and I.S. ONOPRIENKO:

Insulin-like effects of serum albumin and globulin fractions on glucose uptake by rat epididymal adipose tissue. *Diabetes* **8**, 438–441 (1959). — ² BRAUER, R.W., R.L. PESSOTTI and P. PIZZOLATO: Isolated rat liver preparation. Bile production and other basic properties. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **78**, 174–181 (1951). — ³ BROWN, H., F. SANGER and R. KITAI: The structure of pig and sheep insulins. *Biochem. J.* **60**, 556–565 (1955). — ⁴ BÜRGI, H., E.B. RAMSEIER, E.R. FROESCH, P. BALLY und A. LABHART: „Freies“ und „gebundenes“ Insulin im Serum von Patienten mit B-Inselzell-Adenom. *Helv. med. Acta* **29**, 527–534 (1962). — ⁵ BÜRGI, H., K. KOPETZ, K. SCHWARZ und E.R. FROESCH: Fate of rat insulin in rat-liver perfusion studied by adipose-tissue assay. *Lancet* **2**, 314–316 (1963). — ⁶ CAHILL, G.F., Jr., B. LEBOEUF and R.B. FLINN: Studies on rat adipose tissue in vitro. VI. Effect of epinephrine on glucose metabolism. *J. biol. Chem.* **235**, 1246–1250 (1960). — ⁷ COHEN, S., A.H. GORDON and C. MATTHEWS: Catabolism of γ -globulin by the isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* **82**, 197–205 (1962). — ⁸ COOPERSTEIN, S.J. and A. LAZAROW: Alloxan inactivation of coenzyme A and the pigeon liver acetylating enzyme. *J. biol. Chem.* **232**, 695–703 (1958). — ⁹ Lit. vgl. Documenta Geigy, wiss. Tab., 6. Aufl. (1960), Seite 426. — ¹⁰ Lit. vgl. Documenta Geigy, wiss. Tab., 6. Aufl. (1960), Seite 444. — ¹¹ Lit. vgl. Documenta Geigy, wiss. Tab., 6. Aufl. (1960), Seite 446. — ¹² Lit. vgl. Documenta Geigy, wiss. Tab., 6. Aufl. (1960), Seite 447. — ¹³ Lit. vgl. Documenta Geigy, wiss. Tab., 6. Aufl. (1960), Seite 451. — ^{13a} VALLEE, B.L. and J.G. GIBSON: The zinc content of normal human whole blood, plasma, leucocytes, and erythrocytes. *J. biol. chem.* **176**, 445–457 (1949). — ¹⁴ FAHEY, J.L., P.F. MCCOY and M. GOUJIAN: Chromatography of serum proteins in normal and pathologic sera: the distribution of protein-bound carbohydrate and cholesterol, siderophilin, thyroxine-binding protein, B₁₂-binding protein, alkaline and acid phosphatases, radioiodinated albumin and myeloma proteins. *J. clin. Invest.* **37**, 272–284 (1958). — ¹⁵ FREUND, J., K.J. THOMSON, H.B. HOUGH, H.E. SOMMER and T.M. PISANI: Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. *J. Immunol.* **60**, 383–398 (1948). — ¹⁶ FROESCH, E.R., H. BÜRGI, E.B. RAMSEIER, P. BALLY und A. LABHART: Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. clin. Invest.* **42**, 1816–1834 (1963). — ¹⁷ FROESCH, E.R., H. BÜRGI, W.A. MÜLLER und A. LABHART: Mit Antinsulin hemmbare und nicht-hemmbar Insulinaktivität im menschlichen Serum. *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 309–313 (1964). — ¹⁸ GOLDBERG, H.L. and R.H. EGDAHL: Studies suggesting the extra-pancreatic production of substances with insulin-like activity. *Fed. Proc.* **20**, 190 (1961). — ¹⁹ GORDON, A.H. and J.H. HUMPHREY: Methods for measuring rates of synthesis of albumin by the isolated perfused rat liver. *Biochem. J.* **75**, 240–247 (1960). — ²⁰ GORDON, A.H.: Detection of liver proteins in circulating blood. *Nature, Lond.* **189**, 727–728 (1961). — ²¹ GRODSKY, G.M. and P.H. FOR-

HAM: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J. clin. Invest.* **39**, 1070–1079, (1960). — ²² HARRIS, J.I., F. SANGER and M.A. NAUGHTON: Species differences in insulin. *Arch. Biochem.* **65**, 427–438 (1956). — ²³ HAUGAARD, N. and J.B. MARSH: Effect of insulin on the metabolism of adipose tissue from normal rats. *J. biol. Chem.* **194**, 33–40 (1952). — ²⁴ HOŘEJSÍ, J. and R. SMETANA: The isolation of gamma globulin from blood-serum by rivanol. *Acta med. scand.* **155**, 65–70 (1956). — ²⁵ ISHIBARA, Y., T. SAITO, Y. ITO and M. FUJIMO: Structure of sperm-and sei-whale insulins and their breakdown by whale pepsin. *Nature, Lond.* **181**, 1468–1469 (1958). — ²⁶ KEEN, H.: Properties of human „albumin“. A metabolic study of albumin extracts from normal and diabetic plasma. *Diabetes*, **12**, 406–413 (1963). — ²⁷ KREBS, H.A. und K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **210**, 33–66 (1932). — ²⁸ LEBOEUF, B. and G.F. CAHILL, Jr.: Studies on rat adipose tissue in vitro. VIII. Effect of preparations of pituitary adrenocorticotrophic and growth hormones on glucose metabolism. *J. biol. Chem.* **236**, 41–46 (1961). — ²⁹ LEE, H.M., R.M. ELLIS and M.V. SIGAL, Jr.: Some insulin-like effects of nicotinic acid observed with isolated rat epididymal adipose tissue. *Biochim. biophys. Acta* **49**, 408–410 (1961). — ³⁰ LEONARDS, J.R.: Insulin-like activity of blood what is it? *Fed. Proc.* **18**, 272 (1959). — ³¹ LI, C.H., N.R. MOUDGAL and H. PAPKOFF: Immunochemical investigations of human pituitary growth hormone. *J. biol. Chem.* **235**, 1038–1042 (1960). — ³² MASKE, H.: Beobachtungen über das Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas und seine Beziehungen zur Insulfunktion. *Z. Naturforsch.* **8b**, 96–104 (1953). — ³³ MASKE, H., H. WOLFF und B. STAMPFL: Über die Verhinderung der diabetogenen Alloxanwirkung durch vorhergehende Glucosegaben. *Klin. Wschr.* **31**, 79–81 (1953). — ³⁴ MATSCHINSKY, F., U. MEYER und O. WIELAND: Die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin auf die isolierte Rattenleber. *Biochem. Z.* **333**, 48–61 (1960). — ³⁵ MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON and W.F. BALE: Dominant role of liver in plasma protein synthesis; direct study of isolated perfused rat liver with aid of lysine- ϵ -C¹⁴. *J. exp. Med.* **94**, 431–453 (1951). — ³⁶ MIRSKY, I.A. and G. PERISUTTI: Action of oxytocin and related peptides on epididymal adipose tissue of the rat. *Endocrinology* **71**, 158–163 (1962). — ³⁷ MOLONEY, P.J. and M. COVAL: Antigenicity of insulin: diabetes induced by specific antibodies. *Biochem. J.* **59**, 179–185 (1955). — ³⁸ NICOL, D.S.H.W. and L.F. SMITH: Amino-acid sequence of human insulin. *Nature, Lond.* **187**, 483–485 (1960). — ³⁹ PITTMAN, J.A., B.R. BOSHELL, B.H. WILLIAMS, D. HAMNER and P. HILL: Insulin-like activity of vasopressin and oxytocin. *Biochem. biophys. Res. Comm.* **6**, 29–32 (1961). — ⁴⁰ RESNIK, R.A. and A.R. WOLFF: The reaction of alloxan with glutathione and protein. *Arch. Biochem.* **64**, 33–50 (1956). — ⁴¹ SAMAAAN, N.A., W.J. DEMPSTER, R. FRASER, N.W. PLEASE and D. STILLMAN: Further immunological studies on the form of circulating insulin. *J. Endocrin.* **24**, 263–277 (1962). — ⁴² SAMAAAN, N., D. STILLMAN and R. FRASER: Abnormalities of serum insulin-like activity in liver-disease. *Lancet* **2**, 1287–1290 (1962). — ⁴³ SAMAAAN, N.A., W.J. DEMPSTER, R. FRASER and D. STILLMAN: Changes in levels of „atypical“ circulating insulin after infusing „typical“ insulin through the liver. *J. Endocrin.* **26**, 1–10 (1963). — ⁴⁴ SAMAAAN, N., R. FRASER and W.J. DEMPSTER: The „typical“ and „atypical“ forms of serum insulin. *Diabetes* **12**, 339–348 (1963). — ⁴⁵ SCHIMASSEK, H.: Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber. *Biochem. Z.* **336**, 460–467 (1963). — ⁴⁶ SISS, E.: Dissertation München 1965. — ⁴⁷ SISS, E., A. TEINZER und O. WIELAND: Bildung nichthemmbarer „Insulin Like Activity“ (ILA) in der Rattenleber. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft f. physiol. Chemie Köln, 21.–24. Okt. 1964. — ⁴⁸ SISS, E., A. TEINZER und

O. WIELAND: Eine vereinfachte Fettgewebismethode zur Insulinbestimmung im Serum. In Vorbereitung. — ⁴⁹ SILVERMAN, J. L.: Glucosamine inhibition of (1-C¹⁴) glucose oxidation as measured by rat adipose tissue in vitro. *Biochim. biophys. Acta* **78**, 94—100 (1963). — ⁵⁰ SMIKIN, B. and R. ARCE: Prolactin activity in blood during the normal human menstrual cycle. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* **113**, 485—488, (1963). — ⁵¹ SLATER, J. D. H., N. SAMAN, R. FRASER and D. STILLMAN: Immunological studies with circulating insulin. *Brit. med. J.* **1**, 1712—1715 (1961). — ⁵² SOBER, H. A., F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF and E. A. PETERSON: Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum protein on anion-exchange cellulose. *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 756—763 (1956). — ⁵³ STEINKE, J., A. SIREK, V. LAURIS, F. D. W. LUKENS and A. E. RENOLD: Measurement of small quantities of insulin-like activity with rat adipose tissue. III. Persistence of serum insulin-like activity after pancreatectomy. *J. clin. Invest.* **41**, 1699—1707 (1962). — ⁵⁴ UNGER, R. H., A. M. EISENTRAUT and L. L. MADISON: The effects of total starvation upon the levels of circulating glucagon and insulin in man. *J. clin. Invest.* **42**, 1031—1039 (1963). — ⁵⁵ WEIGLE, W. O., F. J. DIXON and M. P. DEICHMILLER: Effect of mycobacteria on antibody production induced by water-

in-oil emulsions of soluble protein antigens. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* **105**, 535—541 (1960). — ⁵⁶ WILSON, S. and G. H. DIXON: A comparison of cod and bovine insulins. *Nature, Lond.* **191**, 876—879 (1961). — ⁵⁷ WINEGRAD, A. I., W. N. SHAW, F. D. W. LUKENS, W. C. STADIE and A. E. RENOLD: Effects of growth hormone in vitro on the metabolism of glucose in rat adipose tissue. *J. biol. Chem.* **234**, 1922—1928 (1959). — ⁵⁸ WINEGRAD, A. I., W. N. SHAW, F. D. W. LUKENS and W. C. STADIE: Effects of prolactin in vitro on fatty acid synthesis in rat adipose tissue. *J. biol. Chem.* **234**, 3111—3114 (1959). — ⁵⁹ WÖRNER, H. und K. F. WEINGES: Über den Einfluß von Insulin und Glukagon auf den Glucosestoffwechsel des epididymalen Fettanhangs der Ratte in vitro. II. Der Einfluß von Glukagon im Vergleich mit dem Insulineffekt. *Klin. Wschr.* **39**, 243—246 (1961). — ⁶⁰ YAGI, Y., P. MAIER and D. PRESSMAN: Two different anti-insulin antibodies in guinea pig antisera. *J. Immunol.* **89**, 442—451 (1962).

Teil II

Bildung eines insulinartigen Wirkstoffs
durch die isolierte Rattenleber

Summary. The present study presents a simplified method for the measurement of insulin-like activity through its effect on stimulation of glucose-1- ^{14}C oxidation by adipose tissue. Forty determinations can be carried out by two persons in a single day and only two rats are required. The index of precision is in the neighbourhood of 0.13. When the method was applied to the measurement of total insulin-like activity in dialyzed human serum obtained from fasting subjects, the results obtained varied between 78–1020 $\mu\text{U/ml}$ ($465 \pm 68 \mu\text{U/ml}$). Approximately 40 per cent of the total insulin-like activity was suppressible in the presence of insulin antibodies partially purified from guinea pig serum. This was true both for dialyzed serum from fasting subjects and for acid ethanol extracts of serum. There was no increase in the insulin-like activity of serum upon dilution, provided that the radioactivity of the $^{14}\text{CO}_2$ formed was directly plotted against the decreasing serum concentrations. A fictitious increase in the insulin-like activity was obtained, however, when the radioactivity was transformed into insulin equivalents by comparison with a standard curve in buffer. It would seem that this is the result of the observation that insulin standard curves in the presence of serum are flatter than is the case in Krebs-Ringer buffer.

Résumé. Ce travail présente une simplification de la méthode de la mesure de l'activité insulinoïque sérique basée sur l'oxydation du glucose-1- ^{14}C par le tissu adipeux. Avec cette méthode deux personnes peuvent procéder à 40 dosages en une journée en utilisant deux rats seulement. L'index de précision est de l'ordre de 0,13. L'application de la méthode à la mesure de l'activité insulinoïque du sérum humain dialysé révèle la présence de 78 à 1020 $\mu\text{U/ml}$ ($465 \pm 68 \mu\text{U/ml}$). Environ 40% de cette activité insulinoïque totale s'est révélé être supprimable par l'adjonction d'anticorps anti-insuline purifiés à partir de sérum de cobaye. Les mêmes résultats ont été obtenus

tant pour le sérum humain obtenu à jeun et dialysé que pour des extraits éthanoliqes de ces sérums. Lorsqu'on reporte graphiquement la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ produit en proportion de la dilution du sérum, on n'observe pas une augmentation de l'activité insulinoïque résultant de cette dilution. Par contre, une augmentation est observée lorsqu'on rapporte non pas directement la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ mais l'activité insulinoïque correspondante obtenue par comparaison avec des courbes standards dans un tampon. Ceci paraît dû au fait que la pente des courbes standards d'insuline obtenues en présence de sérum est plus faible que celle des courbes obtenues dans le tampon de Krebs-Ringer.

Zusammenfassung. In vorliegender Arbeit wird eine vereinfachte, auf der Stimulation der 1- ^{14}C -Glucoseoxydation beruhende Fettgewebemethode zur Insulinbestimmung im Serum beschrieben. Zwei Personen können an einem Tag 40 Einzelbestimmungen durchführen, wofür nur zwei Ratten benötigt werden. Der Präzisionsindex liegt bei 0.13. Die Anwendung der Methode auf die Bestimmung der gesamten Insulinaktivität in dialysierten menschlichen Nüchternseren ergab Beträge von 78 – 1020 $\mu\text{E/ml}$ ($M = 465 \pm 68 \mu\text{E/ml}$). Mit angereicherten Insulinantikörpern aus Meerschweinchen Serum waren etwa 40% der gesamten Insulinaktivität hemmbar. Dies wurde sowohl in dialysierten menschlichen Nüchternseren, als auch in HCl-Äthanolextrakten aus Serum gefunden. Eine Zunahme der Insulinaktivität durch Serumverdünnung ist nicht zu beobachten, wenn man die Radioaktivität des entwickelten $^{14}\text{CO}_2$ gegen fallende Serumkonzentrationen aufträgt. Eine Aktivitätssteigerung wird jedoch vorgetäuscht, wenn die Impulse über eine Krebs-Bicarbonat-Ringerlösung-Insulin-Eichkurve in μE umgewandelt werden. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß die Insulineichkurven in Anwesenheit von Serum flacher verlaufen, als in serumfreier Krebs-Bicarbonat-Ringerlösung.

Von den vielfältigen Wirkungen des Insulins wurde wohl zum ersten Male von GROEN et al.¹³ und PERLMUTTER et al.²⁴ die von GEMMILL¹⁰ beobachtete Steigerung der Glucoseaufnahme am Rattendiaaphragma zu einer biologischen Bestimmungsmethode für Insulin ausgearbeitet. Seither ist das Rattenzwerchfell^{16, 18, 26, 35, 40} und das Mäusezwerchfell²³ in großem Umfang als Insulintestgewebe benutzt worden. Die Entdeckung, daß das Nebenhodenfettgewebe der Ratte ebenfalls in vitro gegen Insulin hochempfindlich ist²¹, lenkte die Methodik in eine neue Richtung. Zunächst blieb man dabei — ähnlich wie beim Diaaphragma — die Glucoseaufnahme des Fettgewebes als Parameter für die Insulinwirkung heranzuziehen^{3, 15, 33}. Die vermehrte Glucoseaufnahme durch Insulin geht mit einer

erhöhten Fettsäuresynthese einher³⁸. Der damit verbundene Anstieg des RQ äußert sich manometrisch in einem Druckanstieg, der von BALL¹ als Parameter der Insulinwirkung am isolierten Fettgewebe eingeführt wurde. Isotopenversuche MILSTEINS hatten schon 1956 erbracht, daß sich die Insulin-bedingte Stimulierung des Glucoseverbrauches vorwiegend auf das erste C-Atom der Glucose erstreckt²². Hiervon ausgehend wurde die Bestimmung des aus 1- ^{14}C -markierter Glucose gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ als besonders einfache und empfindliche biologische Insulinbestimmungsmethode aufgebaut^{21, 27, 29, 32}. Die hier mitgeteilte Methode beruht im Prinzip auf dem an letzter Stelle genannten Isotopenverfahren. Sie bringt gegenüber den bisher beschriebenen Methoden Vereinfachungen in der Durch-

führung bei mindestens gleicher Empfindlichkeit und Präzision, und — nicht zuletzt — ökonomische Vorteile.

Im folgenden werden die experimentellen Details der Methode, sowie die Anwendung zur Bestimmung der Insulinaktivität von menschlichem Blutserum beschrieben. Über die Verwendung der Methode in Leber-Durchströmungsversuchen, die zur Auffindung einer hepatischen Insulinaktivität geführt haben, ist an anderer Stelle berichtet worden³⁰.

Methodik

Die im folgenden beschriebene Methode bietet gegenüber den bisher üblichen Verfahren den Vorzug, daß für mindestens 20 Einzelbestimmungen nur eine einzige Ratte benötigt wird. Zwei Personen können an einem Tag 40 Einzelbestimmungen durchführen. Dabei liegt der Präzisionsindex $\lambda = 0.13$ in gleicher Höhe, wie er von anderen Autoren angegeben wurde, die mit „Gewebe-pool“ arbeiten und für 12 Einzelbestimmungen 12 Ratten benötigen⁷.

Reaktionsgefäße

Der Aufbau der Reaktionsgefäße basiert auf dem Prinzip, das von KEEN et al.¹⁷ für Isotopenversuche bei Inkubation kleinster Gewebemengen vorgeschlagen wurde. Bei dieser Anordnung liegt der wesentliche Vorteil darin, daß das Absorptionsgefäß für das gebildete $^{14}\text{CO}_2$ zugleich als Zählgefäß dient und keine Radioaktivitäts- und Zeitverluste durch Überführen in ein zweites Gefäß entstehen. Die technischen Einzelheiten sind in Abb. 1 dargestellt. Die Inkubation des Fettgewebes findet in fingerhutartigen Trögen statt, die entsprechend der Skizze in Abb. 1a leicht aus Kunststoff-zentrifugenbechern (Beckman Instr., Nr. 303958) selbst zurechtgeschnitten werden können. Die Reaktionsgefäße werden durch bloßes Einstechen ihrer zugespitzten Enden in durchbohrten Gummistopfen gehalten, wie es in Abb. 1b zu sehen ist. Abb. 1c zeigt das zur Insulinbestimmung vorbereitete Gefäß in Originalwiedergabe. Der Gummistopfen mit den beiden Glasröhrchen und dem beschriebenen Reaktionsgefäß sitzt auf einem leeren Packard-Glasfläschchen (Abstand zwischen Boden Reaktionsgefäß und Boden Packardgefäß ca. 2 mm). Nach 10 min Temperaturausgleich bei 37°C im Schüttelthermostaten und 3 min Begasung mit angefeuchtetem Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) wird das System durch Aufstecken des freien Schlauchendes auf das offene Glasröhrchen gasdicht verschlossen. Nach Inkubation (90 min bei 37°C) werden die Gefäße in Eiswasser gestellt. Zum Sammeln des $^{14}\text{CO}_2$ injiziert man durch eines der Glasröhrchen 0.3 ml β -Phenäthylamin³⁹ (Fluka AG, Buchs SG, redestilliert) in das Außengefäß, durch das andere 0.2 ml 5 N H_2SO_4 in das Innengefäß. Nach 60 min Absorption nimmt man die Stopfen mit den Reaktionsgefäßen ab und hat nur noch 10 ml Bray'scher Seintillationslösung⁴ einzufüllen, um die Zählung auszuführen.

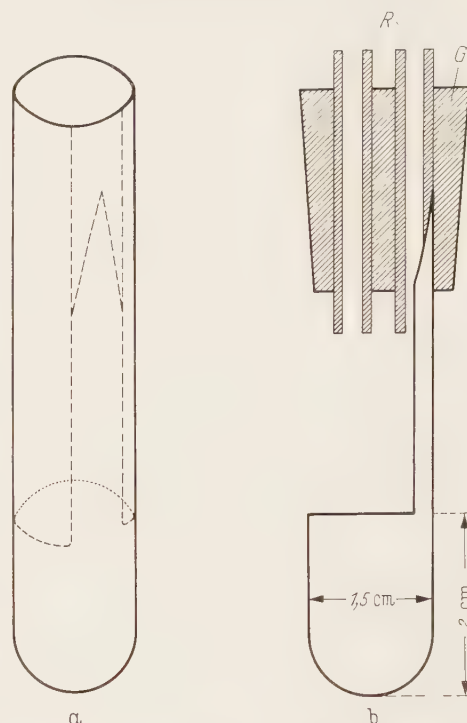


Abb. 1 (a–c). Aufbau des Testgefäßes zur Insulinbestimmung
a) Herstellung des Inkubationstrogens durch Ausschneiden aus einem Plastik-Zentrifugenbecher entlang den gestrichelten Linien
b) Aufhängung des Plastik-Trogens im Gummistopfen (G) durch Einschieben des zugespitzten Endes zwischen Gummi und Glasröhrchen (R)
c) Originalansicht des Testgefäßes; links: Auffang- und Inkubationsgefäß getrennt, rechts: Gebrauchsfertige Anordnung

Inkubationsansätze zur Insulinbestimmung

a) Aufstellung der Eichkurven mit Insulin-Standardlösungen. Die Reaktionsgefäße enthielten ca. 20 mg epididymales Fettgewebe (Präparation siehe unten),

0.4 ml Krebs-Bicarbonat-Ringerlösung¹⁹, jedoch phosphatfrei (KBR) pH 7.4, enthaltend 150 mg% Glucose und 100 mg% Gelatine¹⁴, 0.05 ml 1-¹⁴C-Glucose (= 0.05 μ C, spez. Aktivität 23.0 $\frac{\text{mC}}{\text{mmol}}$, bezogen von Radiochemical Centre Amersham, England), 0.05 ml Insulinlösung*. Die Gelatine wurde in Substanz vor Begasung der KBR-Lösung mit Carbogen zugesetzt und der nicht in Lösung gegangene Anteil abfiltriert. Die Insulinverdünnungen wurden am gleichen Tag aus einer Stammlösung mit einem Gehalt von 1 mg Insulin/ml 0.004 N HCl mit KBR hergestellt.

b) *Insulinbestimmung im Serum*: Die Ansätze enthielten ca. 20 mg Fettgewebe, 0.4 ml Serum bzw. Serumverdünnung mit KBR und Gelatinezusatz, wie oben, 0.05 ml 1.5% Glucoselösung und 0.05 ml 1-¹⁴C-Glucose (= 0.05 μ C, spez. Aktivität s.o.). Zur Gewinnung hämolysefreien Serums wurde Venenblut 3–4 Std bei 4°C stehen gelassen und anschließend bei Zimmertemperatur 10 min bei 2000 U. p. min auf einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Zur Entfernung eventuell im Serum vorliegender, niedermolekularer Hemmstoffe — z.B. Glucosamin³¹ — wurden alle Seren vor Versuch dialysiert. Dies erleichterte gleichzeitig die Einstellung definierter Glucosekonzentrationen im Testansatz. Wir dialysierten über Nacht bei 4°C gegen KBR¹⁹. Vorversuche mit Kristallinsulin zeigten, daß die Dialyse keinen Aktivitätsverlust zur Folge hatte. Nach Dialyse betrug der Serumglucosegehalt enzymatisch getestet 1–2 mg%. (Boehringer Farb-Testkombination zur enzymatischen Bestimmung der „wahren Glucose“. C.F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim.) Die Serumverdünnungen wurden am Versuchstag mit KBR hergestellt.

Zur Bestimmung des Antikörper-hemmbarren Anteils der Seruminsulinaktivität wurden 0.9 ml Serum mit 0.1 ml Insulinantikörper (IAK)³⁰ bzw. KBR 90 min vorinkubiert und davon 0.4 ml in den Test eingesetzt, wie früher beschrieben³⁰. Die Darstellung und Reinigung von IAK aus Meerschweinchenserum wurde ausführlich an anderer Stelle mitgeteilt³⁰.

Präparation des Fettgewebes

Als Versuchstiere dienten Sprague Dawley Ratten von 120–150 g Gewicht. Die Tiere hatten bis Versuchsbeginn freien Zugang zu Standardfutter (Altromin®, Fa. Altrogge, Laage, Lippe) und Wasser. Die Nacht vor dem Versuch wurden sie in Einzelkäfige gesetzt. Am Versuchstag wurde die Ratte — nach einem raschen kräftigen Schlag auf den Kopf — dekapitiert und entblutet. Nach breiter Eröffnung des Abdomens, wurde ein Hoden hochgehoben und der Fettgewebsanhang des Nebenhodens unter möglichster Gefäßschonung an der Basis abgeschnitten. Auf einer Glasplatte wurde das Fettgewebe mit 2 Rasierklingen beidhändig in etwa 10–12 annähernd gleiche Teile zu je

20 mg zertrennt und sofort auf eingewogene Gläser, die je 1 ml KBR enthielten, verteilt. Aus Standardisierungsgründen verwendeten wir hierfür die genormten Schraubgläser des Packard-Scintillationszählers. Anschließend wurde der zweite Fettkörper, der bisher noch unter dem Schutz der Bauchdecke lag, in gleicher Weise behandelt. Spitze und Basis des Fettkörpers wurden verworfen. Unmittelbar darauf wurden die beschickten Gläser gewogen (Mettler Analysenwaage), und, wenn nötig, das Gewicht der Fettgewebstückchen so korrigiert, daß sie sich untereinander nicht um mehr als etwa 2 mg unterschieden. Zur Korrektur des seit Anfang der ersten Wägung bis Ende der zweiten Wägung erfolgten Gewichtsverlustes durch Verdunstung wurde bei jedem Versuch ein Kontrollgefäß, enthaltend 1 ml KBR mehrmals zwischendurch gewogen. Nach abgeschlossener Wägung wurden die Gewebstückchen, nachdem sie mit Filterpapier vorsichtig abgetupft worden waren, in die mit Inkubationsmedium gefüllten Reaktionströge übergeführt.

Wahl der geeigneten Bezugsgröße für die ¹⁴CO₂-Bildung

In Abb. 2 sind die in der beschriebenen Anordnung gemessenen ¹⁴CO₂-Impulse in Abhängigkeit verschiedener Bezugswerte des eingesetzten Fettgewebes dargestellt. Man erkennt in Kurve a der Abb. 2, daß bei der Auftragung der Impulszahl (Imp) gegen das Fettgewebsfrischgewicht (G) der durch die Gewichtsunterschiede der einzelnen Gewebstückchen bedingte Fehler am größten ist. Eine Verbesserung ergibt die Auftragung Imp gegen $\sqrt{G}$ (Kurve b). Der Fehler wird weitgehend eliminiert, wenn man die entwickelten Impulse zur Fettgewebsoberfläche $\sqrt[3]{G^2}$ in Beziehung setzt (Kurve c). Nur in diesem Fall liegt innerhalb des durch vertikale Strecken begrenzten Arbeitsbereiches von 16–25 mg Fettgewebe Linearität zwischen Impulszahl und eingesetztem Fettgewebe vor. Es wurde deshalb in allen Versuchen als Bezugsgröße die Fettgewebsoberfläche $\sqrt[3]{G^2}$ zugrundegelegt.

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der ¹⁴CO₂-Entwicklung. Man erkennt in Kurve a die annähernd lineare Nettoimpulsentwicklung über einen Zeitraum von 180 min. In unseren Versuchen wurden die Inkubationen im allgemeinen 90 min durchgeführt. Für die Bestimmung der mit IAK-hemmbarren Insulinaktivität erschien es von Interesse, die Stabilität des Insulin-IAK-Komplexes unter unseren Versuchsbedingungen zu prüfen. Aus diesem Grund wurden in Parallelansätzen subtotale Hemmdosen von IAK eingesetzt (Kurve b). Aus dem linearen Kurvenverlauf ist zu entnehmen, daß eine über 180 min andauernde irreversible Hemmung des Insulins vorliegt.

Eichkurven mit Insulin-Standardlösungen

Abb. 4 stellt die Abhängigkeit der Nettoimpulse/Oberfläche vom Logarithmus der eingesetzten Dosis im Bereich von 5×10^0 bis $5 \times 10^5 \mu$ E Insulin dar. Wie man ersieht, nimmt die Impulsentwicklung bis 500 μ E

* Rinderkristallinsulin, glukagonfrei, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst. Herrn Prof. HELMUT MASKE danken wir sehr für die Überlassung von Versuchspuben.

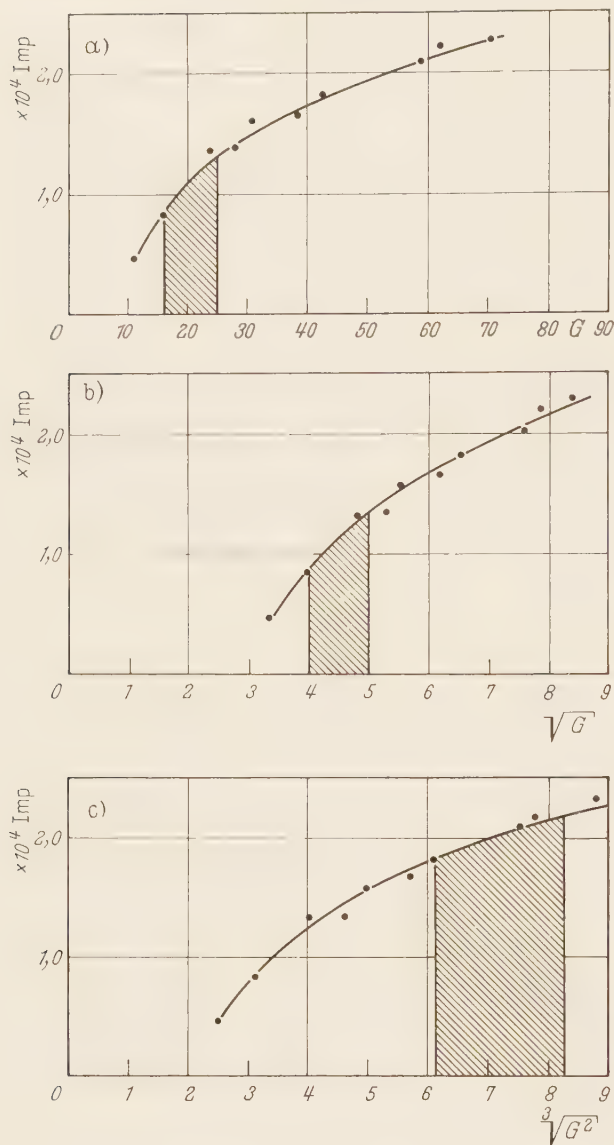


Abb. 2 (a-c). Wahl der geeigneten Bezugsgröße für die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung
Näheres vgl. Text

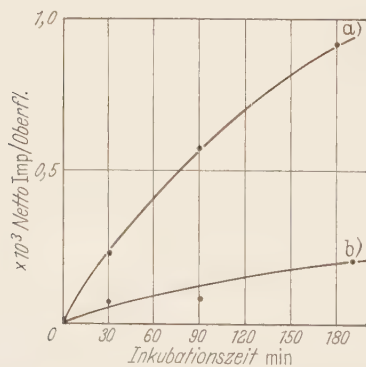


Abb. 3. Zeitabhängigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung. Testbedingungen vgl. Methodik, Insulindosis 250 μE /Ansatz. a = ohne IAK, b = mit IAK

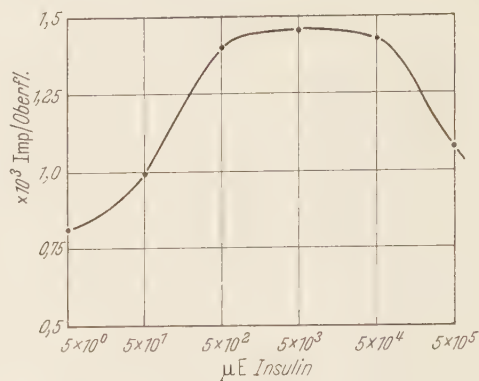


Abb. 4. Dosis-Wirkungskurve im Bereich von 5 bis $5 \times 10^5 \mu\text{E}$ Insulin

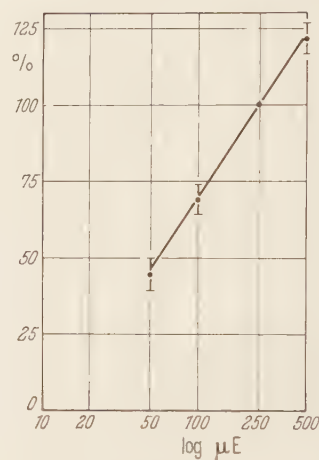


Abb. 5. Mittelwerte von 13 Insulineichkurven. Der Effekt von 250 μE Insulin wurde = 100% gesetzt. Die Stäbe geben den mittleren Fehler der Mittelwerte (SM) an. Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:
 $y = 77.3x - 86.2$

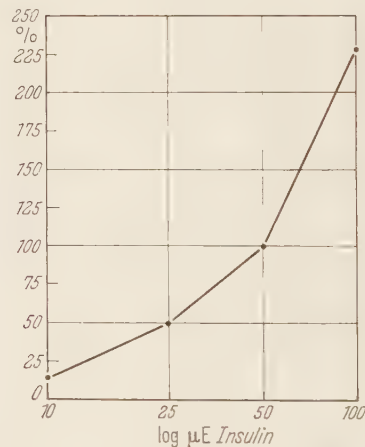


Abb. 6. Unterer Empfindlichkeitsbereich des Insulintestes. Der Effekt von 50 μE Insulin wurde = 100% gesetzt

Insulin/Ansatz bei weitgehender Proportionalität zwischen Dosis und Wirkung zu. Von $5 \times 10^2 \mu\text{E}$ ab verläuft die Kurve in einem Plateau, um schließlich bei $5 \times 10^4 \mu\text{E}$ abzufallen. Der lineare Bereich von 50–500 μE ist auch in der Eichkurve in Abb. 5 zu erken-

nen. Zur näheren Charakterisierung des Kurvenverlaufs unter 50 μE wurde die Eichkurve in Abb. 6 angelegt. Demnach besteht auch im Bereich von 10–50 μE Insulin weitgehende Linearität. Bei 50 μE kommt wiederum — wie auch in Abb. 5 — die Zunahme der Steigung zum Vorschein.

Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle Versuche wurden in Doppelansätzen durchgeführt. Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten mit dem Flüssigkeits-Scintillationsspektrographen, Modell Tri-Carb Nr. 3003 der Firma Packard. Den Impulsauswertungen wurde der Mittelwert aus 3 Zählungen zu je 1 Minute zugrundegelegt.

Der Präzisionsindex wurde nach der Formel: $\lambda = \frac{S_b}{b}$ der Regressionskoeffizient: $b = \frac{\Sigma(x \times y) - \bar{y} \Sigma(x)}{\Sigma(x^2) - \bar{x} \Sigma(x)}$, ermittelt³⁶.

Der mittlere Fehler wurde nach $S_{(x)} = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$ berechnet und daraus der mittlere Fehler des Mittelwertes $S_{(M)} = \frac{S_{(x)}}{\sqrt{n}}$ kalkuliert. Die Gleichung der Regressionsgeraden wurde nach der Beziehung $Y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$; $(S_b)^2 = \frac{1}{n - 2} [\Sigma y^2 - \bar{y} \Sigma y - b(\Sigma(x \times y) - \bar{x} \Sigma y)]$ erhalten.

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel aller x-Werte.

$\bar{y}$ = arithmetisches Mittel aller y-Werte.

$S_{(x)}$ = Standardabweichung.

n = Zahl der Insulinkonzentrationen pro Eichkurve.

Ergebnisse und Diskussion

Insulinbestimmung im Blutserum

Die Anwendung der beschriebenen Methode auf die Bestimmung der Seruminsulinaktivität ergab bei 15 gesunden Versuchspersonen die in Tabelle 1 aufgeführten

Tabelle 1. Gesamtinsulinaktivität normaler menschlicher Nüchternseren

Serum Nr.	$\mu\text{E/ml}$	Serum Nr.	$\mu\text{E/ml}$
1	420	9	285
2	238	10	173
3	78	11	495
4	540	12	165
5	400	13	435
6	600	14	720
7	540	15	870
8	1020		
$M_{15} = 465 \pm 68 \mu\text{E/ml}$			

ten Werte. Der Anteil der mit Insulinantikörpern hemmbaren Insulinaktivität an der Gesamtinsulinaktivität ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Unsere Daten über die gesamte ILA im Serum stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren^{2, 3, 15, 25, 29}. Aber auch kleinere Beträge, sowie

Tabelle 2. Antikörperunterdrückbare Insulinaktivität* in 6 Nüchternseren (A) und Extrakten aus 7 weiteren Seren (B)

A*	B**
Von 100 I. p. m. d. IAK unterdrückbar	Von 100 I. p. m. d. IAK unterdrückbar
36	9
19	24
33	33
10	24
28	23
37	46
$M = 27.2 \pm 4.4$	28
	$M = 26.7 \pm 4.2$

* Bestimmung der Insulinaktivität nach Vorinkubation mit ca. 30-fach angereicherten Antikörpern aus Meerschweinchen-Serum³⁰ (siehe Methodik).

** Serumextraktion nach¹² durch zweistündige Behandlung mit HCl-Äthanol. Der Kontrollversuch ergab nahezu quantitative Ausbeute. Länger ausgedehnte Extraktion führt nach⁵ zur Inaktivierung des Insulins.

extrem hohe Werte von 10 mE/ml wurden berichtet^{7, 20, 26, 40, 41}.

Im Gegensatz zu E. R. FROESCH et al.^{7, 8}, die nur 7% der gesamten Serum ILA mit Meerschweinchen-Antiinsulin-Serum hemmen konnten, erhielten wir sowohl im Serum, wie im HCl-Alkohol-Extrakt aus Serum höhere Beträge. Nach Umrechnung der %-Impulshemmung in %- μE -Hemmung ergeben sich rund 40% durch ungefähr 30-fach angereicherten Antikörper hemmbarer Aktivität. N. A. SAMAAAN et al.²⁸ fanden bei ihren Untersuchungen mit Insulinantiserum Werte von 30–45% im peripheren Blutplasma. Da sowohl FROESCH et al.^{7, 8} als auch SAMAAAN et al.²⁸ mit Meerschweinchenserum, also nicht mit angereicherten Antikörpern gearbeitet haben, ist die Discrepanz ihrer Ergebnisse schwer verständlich.

Zur Frage des „Verdünnungseffektes“

Verschiedene Untersucher haben nach Verdünnung von Blutserum einen Zuwachs der Insulinaktivität im Vergleich zu unverdünntem Serum beobachtet^{9, 20, 37, 40}. Zur Deutung dieser Erscheinung nahm man unter anderem das Vorhandensein von Insulinantagonisten an, deren Wirkung bei zunehmender Serumverdünnung stärker abgeschwächt wird als die Insulinwirkung selbst. Bei Nachprüfung dieses Sachverhaltes konnten wir durch Serumverdünnung keine Zunahme der Seruminsulinaktivität feststellen. Dies wird ersichtlich, wenn man — wie dies in Abb. 7 geschehen ist — die Impulszahlen gegen den log der Serumverdünnung aufträgt. Es werden dabei, analog zu den Insulineichkurven — nach der Beziehung $I = F(\log \text{Insulindosis})$ — Geraden erhalten. Dies stimmt mit der theoretischen Ableitung überein; denn setzt man den unbekannten Insulingehalt des nativen Serums = a , so dürfen in der Verdünnung n^{-1} nur $a \times n^{-1} \mu\text{E}$ gefunden werden. Die zugehörige Impulszahl ergibt sich dann aus $I = F \times \log a \times n^{-1}$, d. h. beim Auftragen der Impulse gegen den log der Verdünnung müssen sich Geraden ergeben, so-

fern a konstant bleibt. Deshalb darf man auf ein Gleichbleiben der Seruminsulinaktivität a zurückschließen, wenn die Auswertung der Experimente Geraden liefert. Da dies in unseren Versuchen zutrifft (vgl. Abb. 7), möchten wir annehmen, daß die Insulinaktivität im gleichen Grade mit der Serumverdünnung abnimmt.

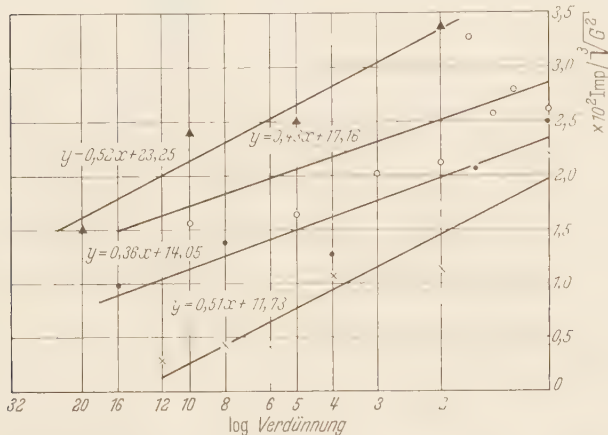


Abb. 7. Lineare Abnahme der Impulsentwicklung mit dem Logarithmus der Serumverdünnung. Die Gleichungen der Regressionsgeraden sind neben den jeweiligen Kurven angeschrieben. Der Ordinatenmaßstab ist mit dem Faktor 6 zu multiplizieren. Erklärung vgl. Text

Die direkte Auftragung der $^{14}\text{CO}_2$ -Impulse gegen die Serumverdünnung wurde mit demselben Ergebnis schon von SHEPS et al.²⁹ vorgenommen. In anderen Arbeiten jedoch wurden die Aktivitäten durchwegs aus Insulineichkurven in KBR-Puffer ermittelt und die so erhaltenen μ -Einheiten den Verdünnungen zugeordnet. Dies setzt aber voraus, daß die Anwesenheit von Serum im Inkubationsmedium die Steigung der KBR-Eichkurve nicht beeinflußt. Wir verglichen zur Prüfung dieser Frage in 4 Versuchen die Steigungen von Eichkurven in KBR und in Serum und erhielten im ersten Fall den Regressionskoeffizienten $b = 0,34$, im zweiten Fall $b = 0,18$. Die obige Voraussetzung scheint demnach nicht zuzutreffen. Auf Grund dieser Untersuchungen halten wir es für möglich, daß der „Verdünnungseffekt“ das Ergebnis der Ablesung aus unzutreffenden Bezugskurven darstellt.

Nachdem die Eichkurve in Gegenwart nativen Serums beträchtlich flacher verläuft, als in reinem KBR-Puffer und auf der anderen Seite ein entsprechendes Standardserum nicht zur Verfügung steht, erscheint es für die praktische Durchführung des Testes ratsam, die Serumproben soweit wie möglich mit KBR zu verdünnen. Wir verwendeten im allgemeinen 1:3 und 1:6 Verdünnungen. Liest man für die gemessenen Impulse die zugehörigen μE aus der jeweils im selben Ansatz mitbestimmten KBR-4-Punkt-Eichkurve ab, so erhält man nach Umrechnung mit dem Verdünnungsfaktor für die 1:6 Verdünnung einen um 18% höheren Wert, als für die 1:3 Verdünnung. Wie schon ausgeführt, ist diese Aktivitätszunahme jedoch nur scheinbar und auf

den unvermeidlichen Fehler in der Ablesung aus der KBR-Eichkurve zurückzuführen. Von den in Tab. 1 mitgeteilten Werten wurden nur Aktivitäten unter $225 \mu\text{E/ml}$ in 1:3 Verdünnungen bestimmt.

Einfluß von Zn^{++}

Wie Abb. 8 zeigt, übt Zink (Zn^{++}) — allerdings in unphysiologisch hohen Konzentrationen — einen deutlichen Hemmeffekt auf die Glucose-1- ^{14}C -Oxydation durch das Fettgewebe aus. Die beobachtete in vitro

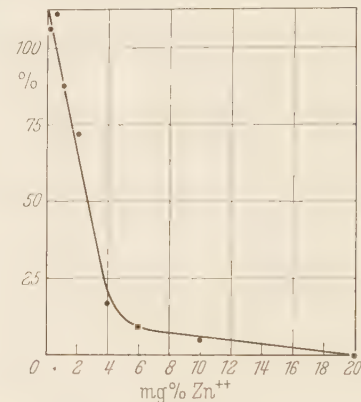


Abb. 8. Hemmung der Insulinwirkung am Fettgewebe durch Zink. Der Effekt von $250 \mu\text{E}$ Insulin wurde = 100% gesetzt. Steigende Konzentrationen von ZnSO_4 , übrige Testbedingungen vgl. Methodik

Hemmung des Insulins durch Zn^{++} kann nicht durch Aktivitätsminderung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die in Leber durch Zn^{++} gehemmt wird⁴¹, erklärt werden, da die Basisaktivität des Fettgewebes unvermindert war. Vielmehr möchten wir annehmen, daß in Anwesenheit von Zn^{++} eine rasche Aggregation von Insulinmolekülen stattfindet, wie sie z. B. von CUNNINGHAM et al.⁶ 1955 beschrieben worden ist. Nach SUND³⁴ bildet Insulin bei einem molaren Zn^{++} -Insulinverhältnis von 0,71 Aggregate bis zu einem Teilchengewicht von $4,5 \times 10^9$. Es sei in diesem Zusammenhang die interessante Beobachtung erwähnt, daß Sulfonylharnstoffderivate das Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht des Insulins zur Dissoziation hin verschieben³⁴.

Für großzügige Unterstützung der vorliegenden Arbeiten danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg und der Eli Lilly Company, Indianapolis, USA.

Literatur

- BALL, E. G., D. B. MARTIN and O. COOPER: Studies on the metabolism of adipose tissue. I. The effect of insulin on glucose utilization as measured by the manometric determination of carbon dioxide output. *J. biol. Chem.* **234**, 774—780 (1959).
- BEIGELMAN, P. M., and H. N. ANTONIADES: Insulin-like activity of human plasma constituents. IV. Insulin levels of normal human serum and plasma. *Metabolism* **7**, 269—273 (1958).
- Insulin-like activity of normal and diabetic human serum. *Diabetes* **8**, 29—35 (1959).
- BRAY, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Analyt. Biochem.* **1**, 279—285 (1960).

- ⁵ CARR, F.H., K. CULHANE, A.T. FULLER and S.W. UNDERHILL: A reversible inactivation of insulin. *Biochem. J.* **23**, 1010—1021 (1929).
- ⁶ CUNNINGHAM, L.W., R.L. FISCHER and C.S. VESTLING: A study of the binding of zinc and cobalt by insulin. *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5703—5707 (1955).
- ⁷ FROESCH, E.R., H. BÜRG, E.B. RAMSEIER, P. BALLY and A. LABHART: Antibody-suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. clin. Invest.* **42**, 1816—1834 (1963).
- ⁸ — — W. A. MÜLLER und A. LABHART: Mit Anti-insulins serum hemmbare und nicht-hemmbare Insulinaktivität im menschlichen Serum. *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 309—313 (1964).
- ⁹ V.D. GELD, H., A.F. WILLEBRANDS, R.E. BOLINGER and J. GROEN: Further results of the determination of serum insulin by the rat diaphragm method. Diabetes mellitus. III. Kongreß der International Diabetes Federation, Düsseldorf, 21.—25. Juli 1958, herausgegeben von K. OBERDISSE und K. JAHNKE, S. 582—584 (1959) Stuttgart Georg Thieme.
- ¹⁰ GEMMILL, C.L.: Effects of glucose and of insulin on metabolism of isolated diaphragm of rat. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **68**, 329—336 (1941).
- ¹¹ GLOCH, G.E., and P. McLEAN: Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* **55**, 400—408 (1953).
- ¹² GRODSKY, G.M., and P.H. FORSHAM: An immunochemical assay of total extractable insulin in man. *J. clin. Invest.* **39**, 1070—1079 (1960).
- ¹³ GROEN, J., C.E. KAMMINGA, A.F. WILLEBRANDS and J.R. BLICKMAN: Evidence for presence of insulin in blood serum; method for approximate determination of content. *J. clin. Invest.* **31**, 97—106 (1952).
- ¹⁴ HILL, J.B.: Adsorption of insulin to glass. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* **102**, 75—77 (1959).
- ¹⁵ HUMMEL, R.E.: Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Ratten-Fettgewebe in vitro. *Experientia* **15**, 256—258 (1959).
- ¹⁶ JESSUP, D.C., and G.S. WIBERG: Insulin bio-assay by glycogen deposition in a single rat diaphragm. *Fed. Proc.* **19**, 162 (1960).
- ¹⁷ KEEN, H., J.B. FIELD and H. PASTAN: A simple method for in vitro metabolic studies using small volumes of tissue and medium. *Metabolism* **12**, 143—147 (1963).
- ¹⁸ KRAHL, M.E., and C.R. PARK: The uptake of glucose by the isolated diaphragm of normal and hypophysectomized rats. *J. biol. Chem.* **174**, 939—946 (1948).
- ¹⁹ KREBS, H.A., and K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **210**, 33—66 (1932).
- ²⁰ LYNDSØE, J.: The insulin-like activity in serum determined by the rat epididymal fat method. I. Normal values in undiluted and diluted serum, and the effect of ingestion of glucose. *Acta med. Scand.* **171**, 365—375 (1962).
- ²¹ MARTIN, D.B., A.E. RENOLD and Y.M. DAGENAIS: An assay for insulin-like activity using rat adipose tissue. *Lancet* **1958 II**, 76—77.
- ²² MILSTEIN, S.W.: Oxidation of specifically labeled glucose by rat adipose tissue. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* **92**, 632—635 (1956).
- ²³ OYAMA, J., and R.L. GRANT: Insulin activities of serum by the mouse diaphragm technique. *Fed. Proc.* **18**, 297 (1959).
- ²⁴ PERLMUTTER, M., S. WEISENFELD and M. MUFSON: Bioassay of insulin in serum using rat diaphragm. *Endocrinology* **50**, 442—455 (1952).
- ²⁵ PFEIFFER, E.F., M. PFEIFFER, H. DITSCHUNEIT und C.-S. AHN: Über die Bestimmung von Insulin im Blute am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose. II. Experimentelle und klinische Erfahrungen. *Klin. Wschr.* **37**, 1239—1245 (1959).
- ²⁶ RANDLE, P.J.: Assay of plasma insulin activity by the rat-diaphragm method. *Brit. Med. J.* **1954 I**, 1237—1240.
- ²⁷ RENOLD, A.E., D.B. MARTIN, Y.M. DAGENAIS, J. STEINKE, R.J. NICKERSON and M.C. SHEPS: Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure. *J. clin. Invest.* **39**, 1487—1498 (1960).
- ²⁸ SAMAAN, N.A., W.J. DEMPSTER, R. FRASER, N.W. PLEASE and D. STILLMAN: Further immunological studies on the form of circulating insulin. *J. Endocrin.* **24**, 263—277 (1962).
- ²⁹ SHEPS, M.C., R.J. NICKERSON, Y.M. DAGENAIS, J. STEINKE, D.B. MARTIN and A.E. RENOLD: Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. II. Evaluation of performance. *J. clin. Invest.* **39**, 1499—1510 (1960).
- ³⁰ SIESS, E., A. TEINZER, E. STRUCK und O. WIELAND: Bildung eines insulinartigen Wirkstoffs in der isolierten Rattenleber. *Diabetologia* **1**, 21—27 (1965).
- ³¹ SILVERMANN, J.L.: Glucosamine inhibition of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glucose oxidation as measured by rat adipose tissue in vitro. *Biochim. biophys. Acta* **78**, 94—100 (1963).
- ³² SLATER, J.D.H., N. SAMAAN, R. FRASER and D. STILLMAN: Immunological studies with circulating insulin. *Brit. Med. J.* **1961 I**, 1712—1715.
- ³³ STEELMAN, S.L., R. OSLAPAS and R.D. BUSCH: An improved in vitro method for determination of serum "insulin-like" activity. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.)* **105**, 595—598 (1960).
- ³⁴ SUND, H.: Über die Einwirkung von Sulfonylharnstoffderivaten auf das Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht von zinkhaltigen Proteinen. 4^e Congrès de la Fédération Internationale du Diabète Genève, 10—14 Juillet 1961, Vol. I, publié par M. Demole, Genève, Éditions Médecine et Hygiène, Genève, S. 726—730.
- ³⁵ VALLANCE-OWEN, J., and B. HURLOCK: Estimation of plasma-insulin by the rat diaphragm method. *Lancet* **1954 I**, 68—70.
- ³⁶ WEINGES, K.F., und H. WÖRNER: Über den Einfluß von Insulin und Glukagon auf den Glucosestoffwechsel des epididymalen Fettanhangs der Ratte in vitro. I. Der Einfluß von Insulin und die sich daraus ergebende Möglichkeit der Bestimmung einer insulinähnlichen Aktivität im menschlichen Blut. *Klin. Wschr.* **39**, 238—243 (1961).
- ³⁷ WILLEBRANDS, A.F., H.V.D. GELD and J. GROEN: Determination of serum insulin using the isolated rat diaphragm; the effect of serum dilution. *Diabetes* **7**, 119—124 (1958).
- ³⁸ WINEGRAD, A.I., and A.E. RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro. II. Effects of insulin on the metabolism of specifically labeled glucose. *J. biol. Chem.* **233**, 273—276 (1958).
- ³⁹ WOELLER, F.H.: Liquid scintillation counting of C^{14}O_2 with phenethylamine. *Analyt. Biochem.* **2**, 508—511 (1961).
- ⁴⁰ WRIGHT, P.H.: Plasma-insulin estimation by the rat-diaphragm method. *Lancet* **1957 II**, 621—624.
- ⁴¹ — Plasma-insulin activity in acromegaly and spontaneous hypoglycaemia. *Lancet* **1960 I**, 951—954.

LEBENS LAUF

Am 19. September 1939 wurde ich als jüngstes von vier Kindern des Kreisgartenbauoberinspektors Alois Siess und seiner Ehefrau Maria Siess, geb. Heckner, in Vilshofen/Do geboren und auf die Namen Elmar, Alois röm.-kath. getauft.

Nach dem Besuch der Volksschule von 1945–1950 trat ich in die Realschule Vilshofen, 1956 in die Oberrealschule Passau über, wo ich 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem WS 59/60 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung setzte ich ab SS 1962 das Medizinstudium an der Universität München fort und beendete es hier mit dem Staatsexamen. Seit 1. September 1965 bin ich als Medizinalassistent tätig.

Am 29. Oktober 1965 heiratete ich meine Ehefrau Anna Siess, geb. Teinzer.

